

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
11. Jg. 1973, S. 543—547

## Die Bedeutung von Membranphospholipiden für Antigen-Antikörper-Bindung im Rh-D-System<sup>1)</sup>

Von H. WEICKER, H. SCHMID, J. KROPP, V. HELMSTÄDTER und W. EBERT

Aus der S. J. Thannhauser-Abteilung für Stoffwechseluntersuchungen (Vorstand: Prof. Dr. H. Weicker)  
der Medizinischen Univ.-Poliklinik Heidelberg

(Eingegangen am 28. August/8. Oktober 1973)

Die Rh-D-Antigenität eines gereinigten Membranproteins von Rh-positiven Erythrocyten wurde nach aktiver und passiver Immunisierung von Meerschweinchen in dem SCHULTZ-DALE-Versuch an der glatten Uterusmuskulatur nachgewiesen. Nach Phospholipase A-Inkubation des Testmuskels war keine Antigen-Antikörper-Reaktion mehr auslösbar. Wurde das gereinigte Membranprotein jedoch mit Erythrocyten-Phosphatiden oder synthetischen Lecithinen, die die Fettsäuren Öl- oder Linolsäure in C-2-Position des Glycerins des Phosphatides enthielten, rekombiniert, dann trat bei einem Lipidphosphorgehalt des Rekombinates von 10—18 g/kg eine positive SCHULTZ-DALE-Reaktion auch an Phospholipase-behandelten Muskelsegmenten ein. In dem Albumin-Antialbumin-System hingegen war auch ohne Kombination des Antigens mit Phosphatiden nach Phospholipase A-Inkubation des Testmuskels eine Anaphylaxie zu beobachten. Diese Protein-Phosphatid-Wechselwirkung erscheint Voraussetzung für die Antigen-Antikörper-Reaktion im Rh-D-System.

### *The importance of membrane phospholipids in the antigen-antibody binding in the Rh-D-system*

After active and passive immunization of guinea pigs, the Rh-D-antigenicity of a purified membrane protein from Rh-positive erythrocytes was demonstrated with the smooth uterus muscle by the SCHULTZ-DALE method. No antigen-antibody reaction could be demonstrated after incubation of the test muscle with phospholipase A. Purified membrane protein was recombined with erythrocytes, phosphatides, or synthetic lecithins containing oleic or linoleic acid at C-2 of the glycerol; this a preparation containing 10—18 g lipid phosphorus per kg, which produced a positive SCHULTZ-DALE reaction, even after treatment of the muscle segments with phospholipase A. In the albumin-antialbumin system, however, anaphylaxis was observed in the phospholipase A-treated test muscle, without combination of the antigen with phosphatides. This interaction of protein and phosphatide appears to be a requirement for the antigen-antibody reaction in the Rh-D-system.

In den Untersuchungen über die Rh-D-Antigenität eines kleinmolekularen Membranproteins, isoliert von Rh-positiven Erythrocyten, fanden wir, daß dieses Protein nur an Anti-D gebunden wird, wenn es mit Phospholipiden bestimmter Fettsäurezusammensetzung assoziiert ist. In dem SCHULTZ-DALE-Test hingegen zeigte das Protein auch ohne die Phospholipid-Assoziation sowohl nach aktiver Immunisierung der Versuchstiere mit dem Protein Rh-positiver Erythrocyten als auch nach passiver Sensibilisierung des Testmuskelsegmentes mit Anti-D eine gut reproduzierbare Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Aufklärung dieser Diskrepanz in dem Antigen-Nachweis soll hier mitgeteilt werden.

### Methodik

Die Methoden zur Isolierung und biochemischen Charakterisierung des Membranproteins wurden an anderer Stelle (1, 2, 3) ausführlich dargestellt und sollen hier nur insoweit erwähnt werden, wie sie für das Verständnis der nachfolgenden Untersuchungen erforderlich sind.

Der *Haemagglutinations-Hemmtest* wurde nach der Röhrchen-Methode durchgeführt, wobei das verwandte Anti-D so eingestellt war, daß es mit Rh-positiven papainisierten Erythrocyten gerade noch maximale Agglutination zeigte.

In dem SCHULTZ-DALE-Test (3) wurden folgende Immunisierungen vorgenommen:

#### 1. Aktive Immunisierung (4)

200 g schwere weibliche Meerschweinchen wurden im Abstand von 5 Tagen mit 10,5 und 5 mg Protein, isoliert von Rh-positiven Erythrocyten, zusammen mit 0,5 ml FREUND'schem Adjuvans

immunisiert. Am 20. Tag nach der ersten Injektion wurden die Tiere unter Vermeidung von Schocksymptomen getötet und der Uterus exstirpiert. Das Blut wurde zur Antikörper-Bestimmung durch Herzpunktion entnommen. Die Uterushörner wurden zum SCHULTZ-DALE-Test verwendet, der in Tyrode-Lösung pH 7,2 bei 37°C unter Sauerstoffsättigung durchgeführt wurde.

#### 2. Passive Immunisierung in vivo (5)

Im Abstand von 12 h wurden 2mal 0,5 ml Anti-D-Serum, Titer 1:512, gereinigt über DEAE Cellulose und Hydroxylapatit, 200 g schweren Meerschweinchen i. p. injiziert. Die Uterusexstirpation und Blutentnahme erfolgte wie oben.

#### 3. Passive Sensibilisierung in vitro (6)

Die Uterussegmente wurde 1½ h in einem Anti D-Tyrodebad, bestehend aus 0,2 ml Anti D, Titer 1:512, +0,8 ml Tyrode unter O<sub>2</sub>-Sättigung sensibilisiert und danach zum Versuch verwendet.

#### 4. Phospholipase-Inkubation (Phospholipase A)

Die Phospholipase A-Inkubation des Muskel-Segmentes wurde 1 h bei 37°C in 0,4 ml Tyrodelösung, die 5 µg Phospholipase A 2 pro 100 mg Muskelfeuchtgewicht enthielt, unter ständiger Sauerstoffzufuhr vorgenommen. Hierzu wurde Phospholipase A 2 Boehringer Nr. 15057 *Crotalus terr. terr.* Aktivität 200 U/ml in 0,1 ml dest. Wasser bei 2°C gelöst.

Für den SCHULTZ-DALE-Test wurde im Anschluß an die Phospholipase A-Inkubation des Uterussegmentes mit Anti D in vitro wie unter 3. sensibilisiert.

5. In einer zweiten Versuchsreihe wurden parallel der passiven Sensibilisierung des Muskelsegmentes in vitro mit Anti D mit und ohne Phospholipase A-Inkubation der Testmuskul mit Anti-Albumin 0,05 ml + 0,5 ml Tyrode passiv in vitro sensibilisiert.

Die Versuchsanordnung des SCHULTZ-DALE-Testes, die im einzelnen bereits publiziert wurde, wurde beibehalten. Die Muskelsegmente wurden in einem 5 ml fassenden temperierten, O<sub>2</sub>-

<sup>1)</sup> Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

gesättigten Tyrodebad bei pH 7,2 und 37°C mit einem Biegestab verbunden. Die konstante Muskelspannung wurde mit einem 1 g schweren Silberdraht als Gegengewicht erreicht. Während des Versuches war das Muskelbad mit einem sauerstoff-gesättigten Tyrode-Reservoir verbunden, das nach jedem Versuchsabschnitt den schnellen Wechsel der Badflüssigkeit erlaubt. Die Muskelkontraktionen wurden über den Biegestab in elektrische Impulse gewandelt, die mit Hilfe eines Schreibers registriert wurden. Nach Äquilibration des Testmuskels durch aufeinanderfolgende Zugabe von 10, 4, 2 und 0,2 µg Histamindihydrochlorid in das Tyrodebad wurde zunächst mit nicht-korrespondierenden Antigenen eine unspezifische Kontraktion ausgeschlossen. Bei konstanter Null-Linie wurde 1 mg korrespondierendes Antigen in das Muskelbad appliziert. Nach der durch die Antigen-Antikörper-Reaktion ausgelösten Muskelkontraktion wurde mit der gleichen Antigenmenge die Desensibilisierung überprüft. Nach Abschluß der Untersuchungsreihe wurde an dem gleichen Muskelsegment die Histaminempfindlichkeit mit der Histamindosis getestet, die vor der Antigen-Applikation eine optimale Muskelkontraktion ausgelöst hatte.

Folgende Antigene wurden getestet:

- Phospholipidreiches Ausgangsmaterial, isoliert von Rh-positiven und Rh-negativen Erythrocyten, Lipidphosphorgehalt 9 g/kg,
- gereinigtes Rh-positives Membranprotein, Lipidphosphorgehalt 2 g/kg,
- Protein-Phospholipid-Rekombination, Lipidphosphorgehalt 10–18 g/kg.

Die Phosphorbestimmung wurde nach der Methode von CHEN jr. et al. durchgeführt, die noch eine Phosphormenge von 1 µg erfaßt.

Die Phosphatid-Identifizierung wurde auf Kieselgel-Dünnschichtplatten mit den Laufmitteln Chloroform:Methanol:Wasser (Volumina 130 ml + 50 ml + 8 ml) und Chloroform:Diäthyläther:Eisessig:Wasser (Volumina 60 ml + 50 ml + 20 ml + 20 ml + 15 ml) ausgeführt.

Die Fettsäuren wurden mit methanolischer Salzsäure verestert. Die Methylster wurden mit dem Gaschromatographen Varian 1400 auf einer Metallsäule mit den Dimensionen 2,80 × 0,5 mm i. D.,

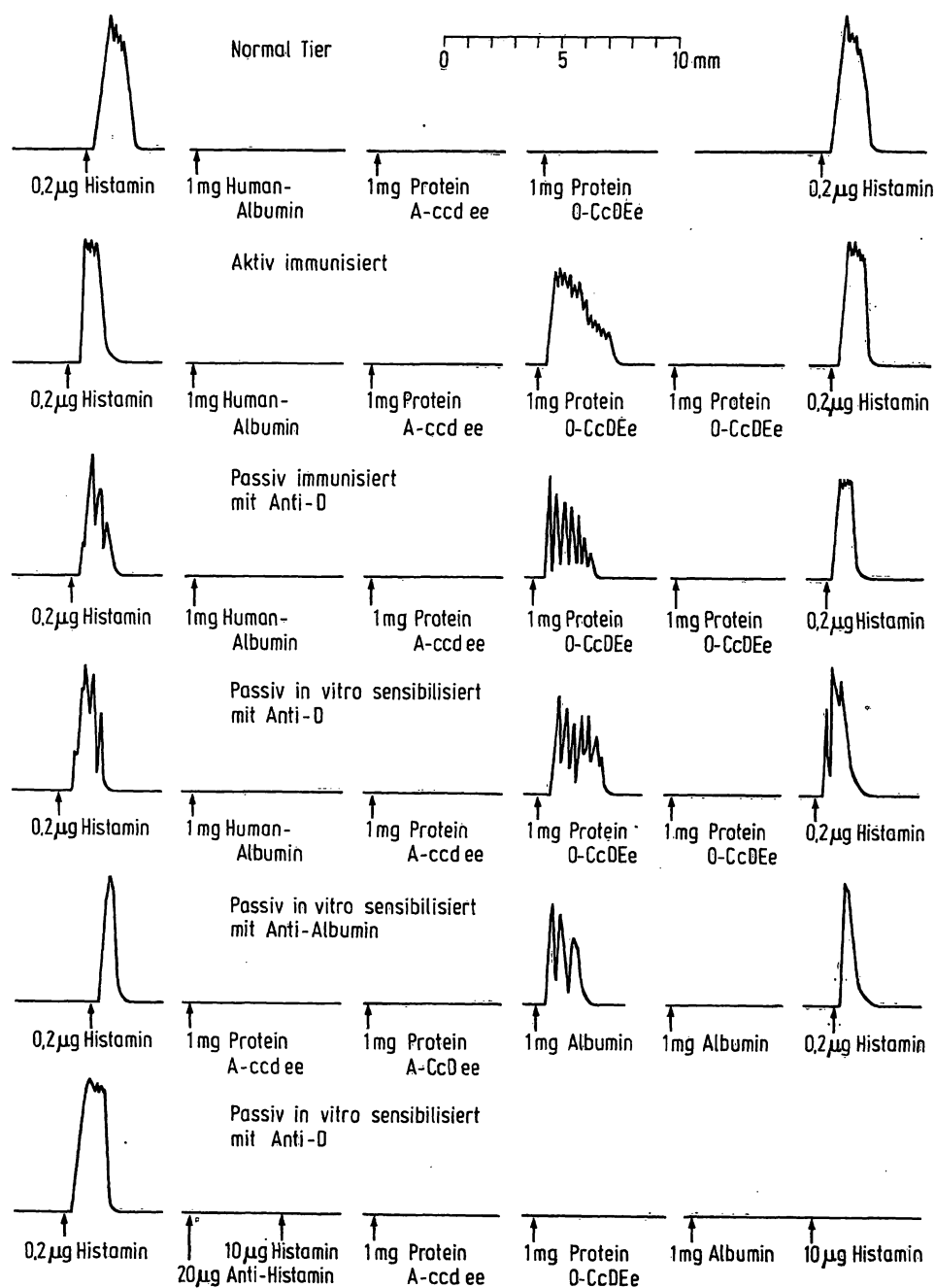


Abb. 1

SCHULTZ-DALE-Test an Meerschweinchenuterushorn nach aktiver Immunisierung mit dem Membranprotein von Rh-positiven Erythrocyten, passiver Immunisierung mit gereinigtem Anti-D in vivo und passiver Sensibilisierung mit gereinigtem Anti-D in vitro. Korrespondierendes Antigen: Rh-positives Protein; nichtkorrespondierende Antigene: Humanalbumin, Rinderalbumin, Protein von Rh-negativen Erythrocyten

belegt mit 10% EGSSX auf Gaschrom P (125–150  $\mu$ m) bei 160°C isotherm aufgetrennt. Als interner Standard wurde 15  $\mu$ g Pentadecansäure injiziert.

Die Lipidphosphor-Verringerung der Muskelmembran durch Phospholipase A-Inkubation wurde im Anschluß an den SCHULTZ-DALE-Test an den Testmuskelsegmenten bestimmt, nachdem 1 h bei 40°C mit Chloroform:Methanol = 20 ml + 10 ml die Phospholipide extrahiert worden waren. Der Lipidphosphorgehalt wurde in der Extraktionslösung gemessen und auf 100 mg Muskelgewicht bezogen. Die Differenz zwischen Phospholipase A-behandelten und nicht Phospholipase A-inkubierten Segmenten ergab die Lipidphosphormenge, die durch Phospholipase A-Inkubation abgespalten worden war.

#### Protein-Phospholipid-Rekombination

10 mg gereinigtes Membranprotein von Rh-positiven bzw. Rh-negativen Erythrocyten, Lipidphosphorgehalt 2 g/kg, wurden in 0,5 ml dest. Wasser gelöst. In 0,5 ml wasserfreiem Äther wurden 5 mg Phospholipid gelöst und nach Zugabe von 0,5 ml H<sub>2</sub>O 30 s mit 60 kHz ultrabeschallt. Danach wurde die wäßrige Proteinlösung mit der phospholipidhaltigen Ätherlösung überschichtet und 2 h bei Raumtemperatur aufbewahrt. Der Äther wurde mit Stickstoff abgedampft. Das Phospholipid-Protein-Rekombinat wurde über Sephadex G 10 an einer 30 cm langen und 0,5 cm weiten Säule gefiltert. Elutionsmittel Wasser; Elutions-

geschwindigkeit 60 ml/h. 1 mg der beiden erhaltenen Fraktionen wurde zur Antigen-Bestimmung im Hämagglutinations-Hemmtest im SCHULTZ-DALE-Versuch eingesetzt.

#### Ergebnisse

Die D-Antigenität des Membranproteins von Rh-positiven Erythrocyten, das ein Molekulargewicht von 4–5000, einen Stickstoffgehalt von 14,5%, einen Lipidphosphorgehalt von 0,2% besitzt, konnte in dem SCHULTZ-DALE-Test am Uterushornmuskelsegment des Meerschweinchens nachgewiesen werden, obwohl es in dem Hämagglutinations-Hemmtest keine Anti-D-Hemmung gezeigt hatte. Eine positive Antigen-Antikörper-Reaktion war sowohl nach aktiver Immunisierung mit dem Protein von Rh-positiven Erythrocyten als auch nach passiver Immunisierung des Versuchstieres in vivo und passiver Sensibilisierung des exstirpierten Uterussegmentes in vitro mit Anti D bei 120 Untersuchungen reproduzierbar (Abb. 1). Lediglich in 4 Versuchen, bei denen mangelnde O<sub>2</sub>-Versorgung des Muskelbades vorgelegen hatte, trat keine adäquate

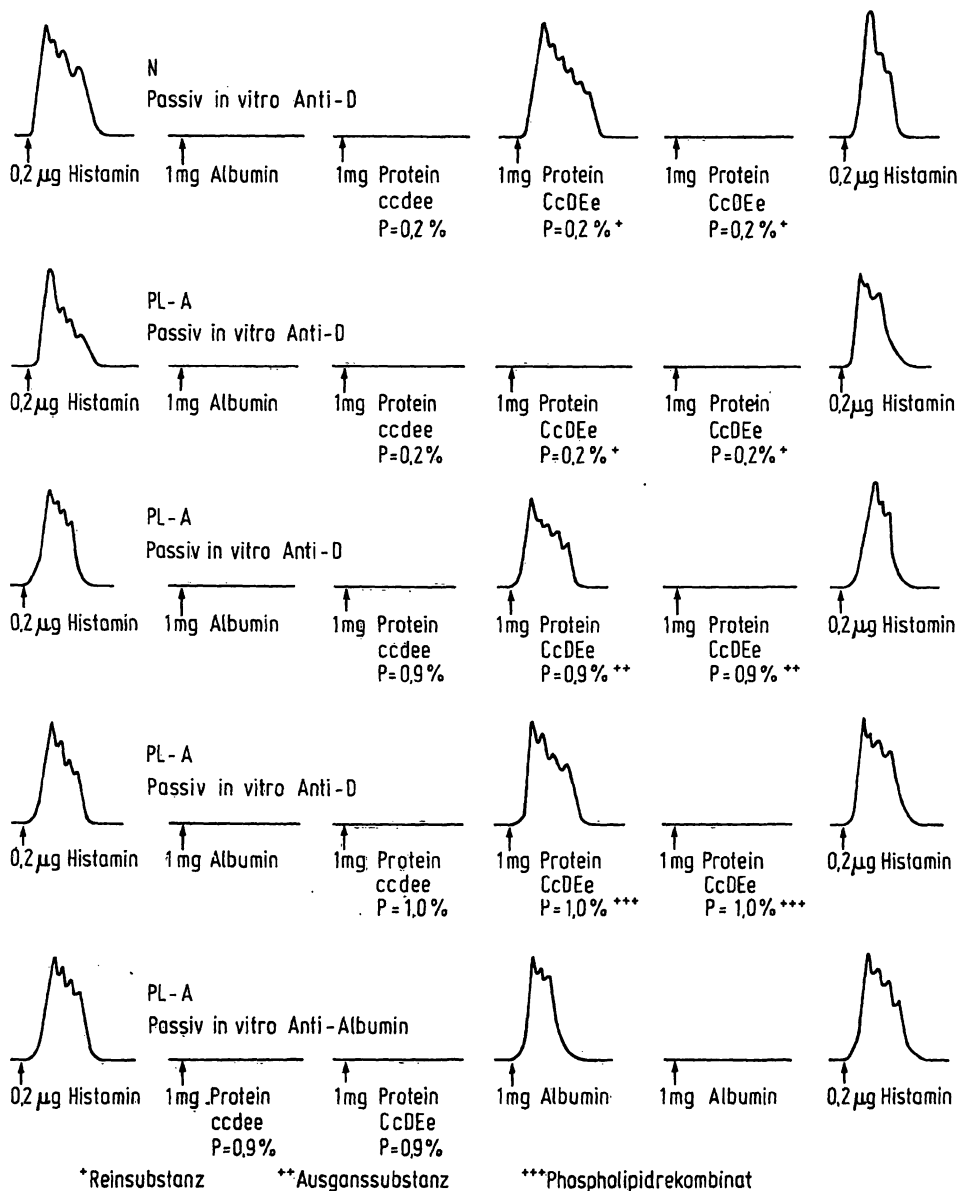


Abb. 2  
SCHULTZ-DALE-Test an Meerschweinchenuterushorn mit (N) und ohne (PL-A) Phospholipase A-Inkubation bei passiver Sensibilisierung mit Anti-D-Vergleichsuntersuchungen im Albumin, Anti-Albumin-System

Tab. 1

SCHULTZ-DALE-Test bei Verwendung verschiedener Antigen-Arten, Bestimmung der Lipidphosphor-Abspaltung nach Phospholipase A-Inkubation des Testmuskels, Ermittlung der Lipidphosphormenge durch Chloroform: Methanol-Extraktion der Testmuskelstücke und P-Bestimmung

Art der Sensibilisierung	Antigen	Versuchs- anzahl n	Lipidphosphor- gehalt des Antigens in g/kg	SCHULTZ-DALE Reaktion	SCHULTZ-DALE Reaktion nach Phospholipase A-Inkubation	Lipidphosphor- verringernach Phospholipase A-Inkubation des Testmuskel- segments in %
Anti-Human-Albumin passiv in vitro	Human-Albumin	12	<—1	12	12	25—30
Anti-Human-Albumin passiv in vitro	Rinder-Albumin	12	<—1	0	0	25—30
Anti-D passiv in vitro	Rh (+) Protein unge- reinigt	7	10—12	7	7	25—30
Anti-D passiv in vitro	Rh (+) Protein ge- reinigt	20	1—2	20	0	25—30
Anti-D passiv in vitro	Rekombinat Rh (+) Protein gereinigtes Erythrocyten- Lecithin	10	12—16	10	10	25—30
Anti-D passiv in vitro	Rekombinat Rh (+) Protein synthetisches Lecithin C <sub>16</sub> C <sub>18</sub>	3	10—14	3	0	25—30
Anti-D passiv in vitro	Rekombinat Rh (+) Protein synthetisches Lecithin C <sub>16</sub> C <sub>18</sub> , <sup>a</sup>	3	10—16	3	3	25—30
Anti-D passiv in vitro	Rh (—) Protein ungereinigt	10	10—12	0	0	25—30
Anti-D passiv in vitro	Rekombinat Rh (—) Protein gereinigt Erythrocyten- Lecithin	5	10—16	0	0	25—30

Muskelkontraktion ein. Phosphatide von Rh-positiven und Rh-negativen Erythrocyten, Proteine von Rh-negativen Erythrocyten und andere nicht-korrespondierende Antigene wie Humanalbumin oder Rinderalbumin führten zu keiner anaphylaktischen Reaktion. Antihistaminica verhinderten die Antigen-Antikörper-Reaktion.

Muskelsegmente, die vor der Sensibilisierung mit Anti D in vitro mit Phospholipase A 2 inkubiert worden waren, zeigten nach Applikation von 2 µg Histamindihydrochlorid noch eine gute Muskelkontraktion. Mit dem gereinigten Membranprotein, dessen Phospholipidgehalt 2 g/kg betrug, war jedoch nach Phospholipase A-Inkubation des Testmuskels keine positive SCHULTZ-DALE-Reaktion auszulösen. Hingegen konnte mit der Phospholipid-reichen Ausgangssubstanz und mit den Protein-Phospholipid-Rekombinaten, bestehend aus dem gereinigten Rh-positiven Protein und Erythrocyten-Lecithin oder -Kephalin eine sichere anaphylaktische Reaktion erhalten werden. In gleicher Weise provozierte auch das Rekombinat aus dem gereinigten Membranprotein mit synthetischen Lecithinen, die in C 2-Position entweder die ungesättigten Fettsäuren Öl- oder Linolsäure enthielten, eine Muskelkontraktion mit Desensibilisierung. Hingegen trat keine positive SCHULTZ-DALE-Reaktion mit dem Protein-Dipalmitin-Lecithin-Rekombinat ein. Voraussetzung für eine positive SCHULTZ-DALE-Reaktion war ein Phosphor-

gehalt von mindestens 10—15 g/kg und die Gegenwart der ungesättigten Fettsäuren in C 2-Position des Glycerins von Lecithin oder Kephalin. Im Gegensatz zu dem Membranprotein Rh-positiver Erythrocyten konnte mit Humanalbumin auch nach Phospholipase A-Behandlung des Testmuskels bei passiver Sensibilisierung des Testmuskels mit Anti-Albumin in vitro eine Antigen-Antikörper-Reaktion erhalten werden, ohne daß eine Phospholipid-Kombination des Antigens durchgeführt worden war (Abb. 2).

Die Protein-Phospholipid-Rekombinate des Rh-positiven Proteins, die an Phospholipase A behandelten Muskelsegmenten eine Anaphylaxie ausgelöst hatten, hemmten Anti-D im Hämagglutinations-Hemmtest mit 3—4 Titerstufen. Die Phospholipid-Verringerung durch Phospholipase A-Inkubation des Testmuskels betrug 25—30% der mit Chloroform-Methanol extrahierbaren Phospholipide (Tab. 1).

### Diskussion

Da mit dem gereinigten Membranprotein im SCHULTZ-DALE-Test nach aktiver und passiver Immunisierung eine gut reproduzierbare Antigen-Antikörper-Reaktion zu erzielen war, ist anzunehmen, daß dieses Protein für die D-Antigenität im Rh-System verantwortlich ist. Bei der Antigen-Antikörper-Bindung ist jedoch die Gegenwart eines Phospholipides notwendig, da nach Phospholipase-Behandlung des Testmuskels mit gereinigtem

Rh-positiven Protein keine SCHULTZ-DALE-Reaktion mehr auslösbar war. Hingegen trat nach Rekombination dieses Proteins mit Lecithin oder Kephalin von Rh-positiven oder Rh-negativen Erythrocyten auch an dem Phospholipase A behandelten Muskelsegment eine Anaphylaxie ein. Die Protein-Phospholipid-Rekombination, über die an anderer Stelle ausführlich berichtet werden soll, führte nur zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion, wenn in C 2-Position des Glycerins des Phospholipides die ungesättigten Fettsäuren Öl- oder Linolsäure vorlagen und der Lipidphosphorgehalt höher als 10 g/kg war. Die Bedeutung dieser ungesättigten Fettsäuren konnten wir durch synthetisches Lecithin zeigen, bei dem das Rekombinat mit Dipalmitin-Lecithin keine Anaphylaxie auslöste, hingegen synthetische Lecithine mit Öl- oder Linolsäure in C 2-Position des Glycerins des Lecithins eine eindeutige Antigen-Antikörper-Reaktion zeigten. Aufgrund dieser Befunde ist anzunehmen, daß die für die Antigen-Antikörper-Bindung erforderliche Proteinkonformation durch adäquate Phospholipide induziert werden kann. In dem SCHULTZ-DALE-Test übernehmen Phospholipide der Muskelfibrille die Rolle der Erythrocytenmembran-Phospholipide, so daß auch das gereinigte Protein bereits eine Antigen-Antikörper-Reaktion auslöst. Da sowohl Phospholipide von Rh-positiven als auch von Rh-negativen Erythrocyten zur erfolgreichen Rekombination verwendet werden konnten, ist es unwahrscheinlich, daß Phospholipiden eine spezifische Antigen-Eigenschaft zukommt. Diese Befunde entsprechen den Ergebnissen von GREEN (8, 9, 10), der fand, daß Rh-positives Erythrocytenstroma nach Butanol- oder Chloroform-Methanol-Extraktion kein Anti-D mehr bindet. Erst nach Rekombination des extrahierten Rh-positiven Stromas mit Phospholipiden, unabhängig davon, ob sie von Rh-positiven oder Rh-negativen Erythrocyten gewonnen worden waren, konnte die Rh-D-Antigenität des Stromas bis zu 75% wieder

erhalten werden. Hierbei zeigte Lecithin einen besseren Effekt als Kephalin. Da wir in dem Albumin-Anti-Albumin-System auch an Phospholipase A-behandelten Muskelsegmenten ohne Phospholipid-Kombination des Antigens eine positive SCHULTZ-DALE-Reaktion erhielten, ist anzunehmen, daß die Gegenwart der Phospholipide nur für das D-Anti-D-System entscheidend ist. Analog zu anderen Phospholipid-Protein-Komplexen ist es deshalb zu diskutieren, ob die Antigen-Antikörper-Bindung im Rh-System von dem  $\alpha$ -Helix-Gehalt des Proteins abhängig ist, der durch Phospholipide begünstigt werden kann. Durch circular dichrographische Messungen vor und nach der Protein-Phospholipid-Rekombination soll diese Frage der Protein-Konformation, die zur optimalen Anti-D-Bindung führt, experimentell untersucht werden.

Die Diskrepanz in dem Rh-D-Antigen-Nachweis zwischen SCHULTZ-DALE-Test und Hämagglutinations-Hemmtest ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse folgendermaßen zu deuten: In dem SCHULTZ-DALE-Versuch erhält das gereinigte Rh-positive Protein durch die adäquaten Phospholipide der Muskelfibrille die für die Antigen-Antikörper-Reaktion erforderliche Konformation. In dem Hämagglutinations-Hemmtest hingegen haben die zellständigen Rh-Antigene der Testerythrocyten durch die benachbarten Membranphospholipide bereits die optimale Konformation, die für die Anti D-Bindung notwendig ist. Sie sind deshalb dem isolierten gereinigten Protein, das keine adäquaten Phospholipide besitzt, überlegen, da das Phospholipidfreie Protein nicht in der für die Antikörper-Bindung erforderlichen Konformation vorzuliegen scheint.

### Danksagung

Den technischen Assistentinnen Frau INGEBORG ENGLERT und Fräulein MARGOT BÜRKLE danken wir für die wertvolle technische Unterstützung bei Durchführung der Isolierung des Membranproteins und der Antigen-Austestung.

### Literatur

1. WEICKER, H., KROPP, J., METZ, J., RITTHALER, F. & EBERT, W. (1972), *Clin. Chim. Acta* 37, 59—70. — 2. WEICKER, H., KROPP, J. & ROELCKE, D. (1971), *diese Z.* 9, 375—382. — 3. DALE, H. H. (1912), *J. Pharm. Exp. Ther.* 2, 221. — 4. COULSON, E. J. (1953), *J. Allergy* 24, 458—473. — 5. KROPP, J. (1970), Dissertation Heidelberg. — 6. HALPERN, B. N., LIACOPOULOS, P., LIACOPOULOS-BRIOT, M. & BINAGHI, R. (1959), *Immunology* 2, 351—362. — 7. CHEN, S. P. jr., TORIBARA, F. Y. & WARNER, H. (1956), *Anal. Chem.* 28, 1756—1759. — 8. GREEN, F. A. (1965), *Vox Sang.* 10, 32—53. — 9. GREEN, F. A. (1968), *J. Biol. Chem.* 243, 5519—5521. — 10. GREEN, F. A. (1972), *J. Biol. Chem.* 247, 881—887.

Prof. Dr. H. Weicker  
69 Heidelberg  
Hospitalstr. 3